第12卷 第4期 动物学研究 Vol. 12. No. 4
1991年11月 ZOOLOGICAL RESEARCH Nov., 1991

中华眼镜蛇蛇毒因子（CVF）对补体系统的作用及与人补体C_3和其他蛇毒抗原性关系*

陈 川** 舒雨雁 庄茂辛 汤圣希
（广西医学院生化教研室） （广西医学院蛇毒研究所）

摘 要

中华眼镜蛇蛇毒经DEAE-Sepharose CL-6B、HPLC等多次柱层析分离出有抗补体及溶血活性的眼镜蛇蛇毒因子(Cobra venom factor, CVF)，纯化后的CVF在聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱上呈单一区带，分子量为225000—230000，等电点为6.20。用二硫苏糖醇还原经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳得三类亚基，其分子量总和为237,000。

体外抗补体及溶血试验表明，CVF的作用是通过补体旁路途经使总补体活力下降。双向免疫电泳鉴定，发现CVF与人血清作用后，其中补体成分C_3分子的抗原性发生改变，则表明CVF的作用是通过激活补体成分C_3而发挥的。给豚鼠腹腔注射CVF（0.15 μg/g体重）后，其血清总补体水平下降到正常值的3％以下，7天后回升，13天后恢复到正常水平。

单相免疫电泳表明，CVF与人补体C_3抗血清间无任何交叉免疫反应，但人血清与CVF抗血清间有微弱的免疫沉淀反应。另外，CVF的氨基酸组成与人补体C_3也较为相似。鉴定还表明眼镜蛇科中四种蛇毒与CVF抗血清有强烈的免疫沉淀反应，蝰蛇毒及海蛇毒也有免疫沉淀反应，但只有眼镜蛇毒具有抗补体活性。

关键词：眼镜蛇蛇毒因子，抗补体活性，补体C_3，免疫电泳，免疫交叉反应

当人们发现眼镜蛇蛇毒中具有抗补体活性的主要成份，并将其分离纯化后，其作用于补体系统的机理就受到许多学者的重视。研究表明在血清中其他血清因子的参与下，CVF作用于C_3，激活补体旁路，导致C_3的消耗，造成血清中补体含量下降。1983年Eggertsen等报道CVF与人及眼镜蛇补体C_3的分子间有共同的抗原决定簇。将CVF与补体C_3分子的理化特性进行比较，发现两者有许多相似之处，因而CVF被认为是C_3存在的另一种选择形式。另外，在其他蛇毒及血清中也发现了CVF样物质的存在，这对蛇毒在免疫学方面的开发利用具有重要意义。

---

* 本课题系国家自然科学基金资助项目

** 原为中国科学院昆明动物研究所研究生

本文1990年2月17日收到，同年12月29日修回。

本实验研究了中华眼镜蛇（*Naja naja atra*）蛇毒因子(CVF)对补体系统的作用及与人补体C_3间的抗原性关系，并利用免疫电泳技术研究了其他8种蛇毒中CVF样物质存在的情况。

材料和方法

一、材料 眼镜蛇毒及实验所用的其他蛇毒冻干粉均为广西医学院蛇毒研究所制备。琼脂糖为瑞典Pharmacia公司出品。溶血素、人外体C_3抗血清为上海生物制品研究所出品。福氏不完全佐剂为美国进口。DEAE-Sepharose CL-6B和CM-Sepharose CL-6B为瑞典Pharmacia产品。二硫苏糖醇为上海东风试剂厂出品。高效液相层析仪为瑞典LKB产品，低压电泳仪为瑞典Pharmacia产品。其他实验试剂纯度符合实验要求。实验动物由广西医学院动物室提供。

二、方法 1．CVF的分离纯化

（1）DEAE-Sepharose CL-6B、CM-Sepharose CL-6B及羟基磷灰石柱层析参照舒雨雁等（1991）方法。

（2）高效液相层析：将上述分离纯化的CVF组分冻干品约5 mg溶于2 ml 0.i1 mol/L磷酸钠缓冲液(pH 7.5内含0.1 mol NaCl)中，用0.22 μm微孔滤膜过滤，然后每次取100 μl上LKB-Utropac. TSK. G3000SW. 75×600 mm柱，并用同一缓冲液洗脱。流速0.5 ml/min，每管收集1 ml。

2．SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定CVF亚基分子量，参照Pharmacia Fine Chemicals（1982）方法并稍加改进。

3．氨基酸组分分析：由广西分析测试中心完成。

4．CVF体外抗补体活力及溶血活力测定：体外抗补体活力测定参照Takahash（1982）方法进行；溶血活力测定按照Vogel（1984）方法进行。

5．CVF体内抗补体活力测定：取345±5g的豚鼠3只，心脏取血，按Takahashi（1982）方法测定其血清总补体活力，然后相隔5小时腹腔注射纯化的CVF两次，每次约25 μg，并于第二次注射CVF后的第1，3，5，7，9，11，13天心脏取血，测定血清中剩余的总补体活力。

6．双向免疫电泳（交叉免疫电脉）按余润等（1982）方法进行。制胶及电泳缓冲液为0.025 mol/L巴比妥—巴比妥钠缓冲液（pH8.6，内含有1 mmol/L EDTA）。取CVF约20 μg溶于20 μl葡萄糖明胶巴比妥缓冲液（简写$GGVB^{2+}$，内含Mg^{2+}、Ca^{2+}）中，再加入正常人血清30 μl，37°C保温20分钟，然后取反应液上样。取20 μl $GGVB^{2+}$代替CVF同样条件处理后上样做对照。

第一相：1%琼脂糖，胶板为2.7×8 cm。电泳时恒压5v/cm 2小时完成。

第二相：1%琼脂糖含30 μl人补体C_3抗血清（效价1:80），胶板为5.4×8 cm。电泳时恒压于4v/cm 15小时完成。

7．CVF抗血清的制备：将CVF用生理盐水配成约0.8 mg/ml的溶液，然后与等体积的福氏不完全佐剂混匀、乳化。取新西兰兔2只，体重约2 kg每隔两周一次，每次用

2 ml 乳化液对兔子进行颈部、背部多点皮下注射。8 周后从自静脉抽血检验抗血清效价，并制备抗血清。

8.单相免疫电泳（火箭电泳）：按余濆方法进行。制胶及电极缓冲液为0.025 mol/L 巴比妥—巴比妥钠缓冲液（pH8.6，内含1 m mol/L EDTA）电泳时恒压5v/cm，时间6 — 7 小时。

结　　果

一、CVF分离纯化：1.经过DEAE-Sepharose CL-6B、CM-sepharose CL-6B、羟基磷灰石等三次柱层析得到CVF组分结果见图 1 。CVF活性峯为 B。

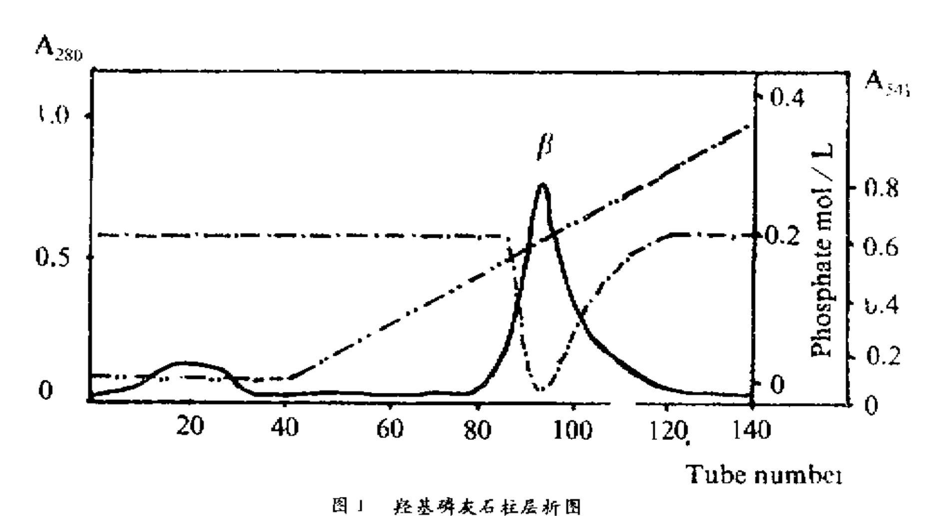


图 1　羟基磷灰石柱层析图

Fig. 1. Isolation of CVF by hydroxyapatite CVF anticoplementary activity (absorbance 541 nm —·—·—·—). NaCl gradient of concentration. —··—··—··—

2.高效液相层析　结果见图 2　CVF活性峯为最高峰。

二、CVF亚基分子量测定和氨基酸组分分析

1. SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳测定亚基分子量。

纯化的CVF及低分子量标准蛋白用含0.05 mol/L 二硫苏糖醇的样品缓冲液加热处理后上样电泳。还原变性后的CVF在电泳图谱上呈现三组区带(图3a)。作曲线图，查出各亚基分子量为 α_1: 70000; α: 66000; β: 45000; γ_1: 29000; γ_2: 27000。各亚基分子量总和为237000。（图3b)

2. CVF的氨基酸组成与C_3比较见表 1 。

三、CVF对补体激活系统的作用　1. CVF的体外抗补体及溶血作用

当CVF加至正常豚鼠血清中，在一系列血清蛋白

图 2　高效液相层析图

Fig. 2. purification of CVF by HPLC.

因子（主要为D因子、B因子）的参于下，激活补体成份，使其耗竭，造成总补体活力水平下降，以致于致敏羊红细胞不能完全胞溶。在CVF激活补体成份的同时，又可看到未致敏的豚鼠红细胞发生胞溶，这说明补体成份的耗竭是通过补体激活旁路完成的。

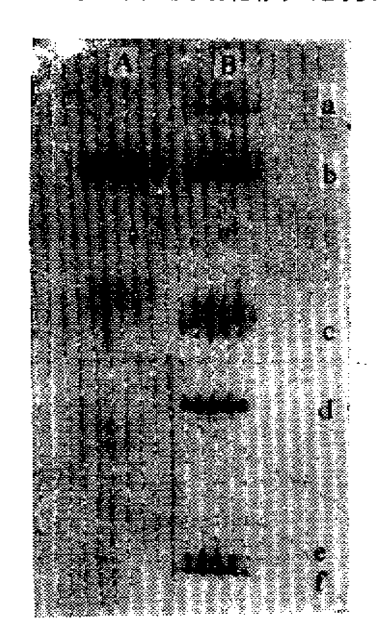


图3a SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 3a SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.
A. Purified CVF by HPLC was subjected to electrophoresis under denaturing condition.
B. Molecular weight standads
a. phosphorylase b, Mw 94000
b. albumin, Mw 67000
c. ovalbumin, Mw 43000
d. carbonic anhydrase, Mw 30000
e. trypsin inhibitor, Mw 20100
f. α-lactalbumin, Mw 14400

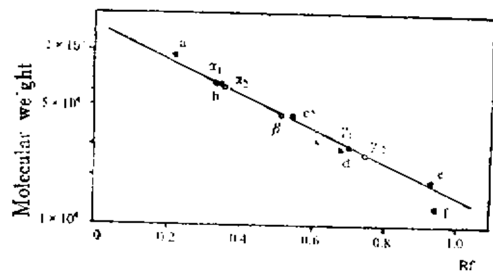


图3b SDS-PAGE，测定CVF亚基分子量曲线图

Fig. 3b Molecular weight determination of subunits of CVF by SDS-PAGE. Molecular weight standards:
a. phosphorylase b, Mw = 94000; b. albumin, Mw = 67000; c. ovalbumin, Mw = 43000; d. carbonic anhydrase, Mw = 30000; e. trypsin inhibitor, Mw = 20100; f. α-lactalbumin, Mw = 14400.

表1 CVF与人C_3、C_3b、C_3c氨基酸组分比较

Tab. 1 Amino acid compositions of CVF and of human C_3, C_3b, and C_3c

Amino acid	CVF	C_3	C_3b	C_3c
Lys.	65	71	70	74
His.	15	17	17	17
Arg.	45	50	45	45
Asp.	123	93	94	99
Thr.	70	61	62	62
Ser.	64	65	66	64
Glu.	133	134	135	125
Pro.	51	48	50	48
Gly.	71	60	61	59
Ala.	68	60	61	51
Cys.	3	13	10	16
Val.	74	89	92	102
Met.	n. d.	19	18	17
Ile.	60	48	49	51
Leu.	84	93	93	86
Tyr.	35	34	34	37
Phe.	40	37	37	38
Try.	n. d.	7	8	8

* Compositions shown are given as nearst integer of residues/1000 residues.

2. CVF对补体成份 C_3 的作用

由双向免疫电泳图谱分析可知，CVF与正常人血清作用后，其中的补体C_3分子被裂解，造成分子的抗原性发生改变，故在电泳图谱上有额外沉淀峰出现（见图4），所以CVF对补体系统的作用首先是通过激活补体成份C_3而发挥的。

3. CVF的体内抗补体作用

当给豚鼠相隔5小时两次腹腔注射共约为0.15 μg/g体重后，其血清中总补体含量在24小时内下降到正常水平的3%以下，7天才开始恢复至正常含量水平。（见图5）

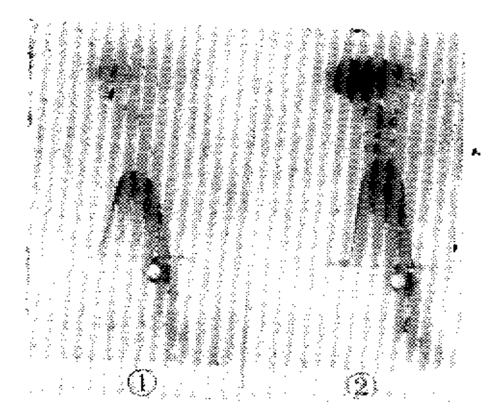


图4　CVF双向免疫电泳图谱

Fig. 4. Human C in its native form left and after activaion of the complement system in vitro with cobra venom factor right when analyzed in crossed immunoelectrophoresis.

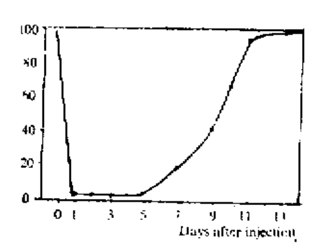


图5　体内抗补体实验曲线

Fig. 5. Serum complement levels in guniea pigs after 50 μg purified CVF divided over two equal doses seperated by a 5 hours interval was i. p. injected. (mean of 3 animals)

四、CVF与人补体C_3的抗原性关系

经单相免疫电泳鉴定，人血清与CVF抗血清间有微弱的交叉免疫反应，（见图6）说明人血清中的补体成份C_3与CVF分子间有共同的抗原决定簇存在。但CVF及其亚基与人补体C_3血清间无任何交叉免疫反应。

将CVF氨基酸组成与人补体C_3及其片段分子的氨基酸组成进行比较（见表1）可发现四者的氨基酸组成极为相似，因而CVF与补体C_3分子在进化上有一定关系。

在研究中还发现，其他蛇毒中也有CVF样物质的存在。

用含有CVF抗血清的1%琼脂糖制胶，将眼镜蛇等9种蛇的粗毒用0.025 mol/L巴比妥—巴比妥钠缓冲液配成约11 mg/ml的溶液，各取15 μl上样，进行单相免疫电泳。由电泳图谱分析可见（图6），眼镜蛇科中的眼镜蛇、眼镜王蛇、金环蛇和银环蛇与CVF有较强的免疫交叉反应。蝰蛇及海蛇科的青环海蛇、平颏海蛇有明显的沉淀线出现，以上各种粗毒（除眼镜蛇毒外）未测得抗补体活性。蝮蛇和尖吻蝮蛇蛇毒与CVF抗血清间无任何交叉免疫反应，但两种粗毒中虽未测到明显的溶血活性，却测到强烈的抗补体活性（体外抗补体活性）。柱层析分离后鉴定表明，这两种蛇毒中具有抗补体活性的组份及纤溶酶、精氨酸酯酶的活性。因而这些组份并非CVF样物质，其抗补体作用机制是不同的。

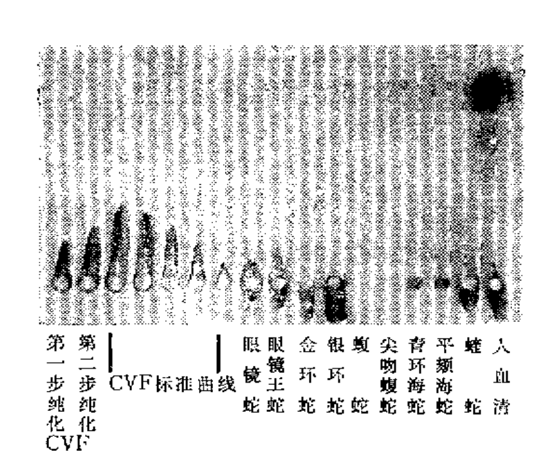


图6 与人C_3其他蛇毒的抗原性关系

Fig. 6. Antigenic relationships between CVF and human C_3 or other kinds of snake venoms. When analyzed in rocket immunoelectrophoresis.

讨　　论

从中华眼镜蛇蛇毒中分离纯化的蛇毒因子与国外其他实验室所得不同来源的CVF一样，具有体内外抗补体活性。与Takahashi等1982年报道的来源于*Naja naja atra*的CVF相比，虽然中华眼镜蛇蛇毒因子体外所测活力低于后者，但体内抗补体活性却大大高于后者。如在引起同样体内效应的情况下，前者所用剂量不足后者的1/3。

在双向免疫电泳实验中，所用的人补体C_3抗血清中可能含有C_3、C_3b，甚至C_3的抗体。虽然第一相电泳时未将C_3、C_3b（两者分子量分别为185000、176000）或其他片段分子分开，但从第二相电泳中出现的不同免疫沉淀线可以看出反应前后的C_3分子的抗原性发生了改变。据此可以说明CVF确实是作用于补体成份C_3。所以是通过裂解、激活C_3而发挥作用的。它能使C_3耗竭，总补体含量下降，达到抗补体的作用。

1983年Eggertsen等报道CVF的α链与人及眼镜蛇补体C_3的β链具有共同的抗原决定簇。Vogel等（1984）对CVF及人补体C_3的氨基酸组成、末端序列、圆二色光谱、二级结构及超微结构的形态学方面的性质进行分析比较，认为两者是由共同的祖先分子进化而来的，是C_3存在的另一种选择形式。在我们的研究中可以看到人血清中C_3分子与CVF有较弱的交叉免疫反应。但CVF及其亚基与人补体C_3抗血清间无任何交叉免疫反应，也许是由于经还原、变性后，CVF及其亚基的抗原性发生了变化。

在CVF抗血清有交叉免疫反应的几种蛇毒（眼镜蛇蛇毒除外）均未测到抗补体活性，估计粗蛇毒中可能存在有溶血毒素干扰了抗补体活力的测定，但与眼镜蛇亲缘关系最近的眼镜王蛇粗毒经DEAE-sepharose CL-6B柱层析分离后，得到五个蛋白峰，逐一测定，均未发现有抗补体活力。虽然Winta等（1980）报道在南美的西部菱斑响尾蛇Western Diamonback rattle snake, Crotalus atrox粗毒中发现了一种CVF样物质的存在，但在同属一科的我国蝮蛇及尖吻蝮蛇的粗毒中并未发现相似物质的存在。因而各种蛇毒中CVF样物质的存在的问题，还需进一步研究。

CVF不具有神经毒性和心脏毒性，只引起注射动物的补体消耗，因而被广泛用于实

验性低补体血症动物模型的制作，以用于与补体有关的许多疾病的研究，这在理论研究及临床应用方面是有实际意义的。

参 考 文 献

余溯等　1982　临床免疫技术，50%溶血试验(简称，CH50)测定血清中总补体活性。上海科技出版社。P118。

舒雨雁、陈川等（1991），中华眼镜蛇 *Naja naja atra* 蛇毒因子的分离纯化及性质的研究。生物化学与生物物理学报　1:35—41。

Alper, C. W. *et al*, 1976 Cobra venom factor: evidence for its being altered cobra C_3 (the third component of complement)., Science., 191, 1275.

Calich, V. L. G. *et al*. 1978 Brazilian snake serum and venom: study of the alternative pathway and C_3 in man and serpart., J. Immunol, 120, 1767.

Eggertsen, G. *et al*. 1983 Antigenic relationships between human and cobra complement factor C_3 and cobra venom factor (CVF) from the indian cobra (*Naja naja*)., J. Immunol., 131, 1920.

Gölze O. *et al*. 1971 The C_3-activator system: an alternative Pathway of complement activation., J. Exp. Med., 134, 905.

Minta, J. O. *et al*. 1980 Immunological, structural and functional relationship between an anticomplementary protein from Crotalus atrox venom, cobra venom factor and human C_3., Immunology., 39, 503.

Muller-Eberhard, H. J. *et al*. 1971 Isolation of anticomplementary protein from cobra venom, and its mode of action on C_3. J. Immunol., 107, 1666.

Pepys, M. B. 1975 Study in vivo of cobra venom factor and murine C_3 Immunology., 28, 369.

Pharmacia Fine Chemicals. 1982 Polyacrylamide gel electrophoresis. Laboratory techniques.

Takahashi, H. *et al*. 1982 Purification and characterization of anticomplement factor (cobra venom factor) from the *Naja naja atra* venom, Biochem. Biophys. Acta., 701, 102.

Vogel, C. W. *et* al. 1984 Cobra venom factor: structural homology with the third component of human complement. J. Immunol., 133, 3235.

Vogel, C. W. *et al*, 1984 Cobra venom factor: improved method for purification and biochemical characterization., J. Immunol. Methods. 73, 203.

Vogt. W 1982 Factors in cobra venoms affecting the complement system, Toxicon., 20, 299.

Vogt, W. *et al*. 1974 Alternative pathway for the activation of complement on human serum. Formation and composition of the complex with CVF that cleaves the third complement of complement., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 171.

ACTION OF CVF ON THE COMPLEMPLEMENT-SYSTEM AND THE ANTIGENIC RELATIONSHIP OF CVF WITH HUMAN C_3 AND OTHER KINDS OF SNAKE-VENOM

Cheu Chuan Shu Yuyan Zhuang Maoxin Tang Shengxi

(Snake venom Research Institute, Dept. of Biochemistry Guangxi Medical College)

Cobra Venom Factor (CVF), an anticomplement factor, had been separated from the venom of Chinese cobra, *Naja naja atra*. The anticomplementary activity and the hemolytic activity of CVF were observed by methods in vitro. Complement C_3 was activated and depleted by CVF through the alternative pathway leading to the decrease of the total complement activity. Cross immunoelectrophoresis showed that antigenicity of C_3 had changed after C had been cleaved by CVF. When guinea pigs were injected i. p. with purified CVF about 0.15 μg per grm body weight, the hemolytic complement activity of guinea pig serum reduced to less than 3 % of normal level within 24 hours and recovered completely after 13 days. No toxic effect of CVF was observed.

On rocket immunoelectrophoresis analysis, CVF and its subunits could not cross react with antiserum to human C_3, but normal human serum could cross react weakly with antiserum to CVF. Amino acid composition of CVF was found to be similar to human C_3 and its physiological cleavage products.

The rocket immunoelectrophoresis analysis showed that some kinds of venom of different snake-species, i. e. for of family Elapidae (*Naja naja atra*), Ophiophagus hannah, Bungarus multicinctus, B. jasciatus), one of Viperinae (Vipera russelli) and two of Hydrophiidae (Hydrophis cyanocinctus, Lapemis hardwickii) had cross reactivity with anti-CVF to some extent, however, these venoms (except the venom of) *Naja naja atra* had no anticomplementary activity. Venoms of two species of Crotalinae (Agkistrodon acutus, A. halys) did not show such cross-reacting, but they had strong anticomplementary activity.

Key words: Cobra venom factor, Anticomplementary activity, Complement C_3, Immunoelectrophoresis, Immune cross-reacting